

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
16 février 2006 (16.02.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2006/016078 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
A61K 38/28, 9/10, 9/51, 47/42

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2005/050431

(22) Date de dépôt international : 9 juin 2005 (09.06.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0451578 19 juillet 2004 (19.07.2004) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
FLAMEL TECHNOLOGIES [FR/FR]; 33, avenue du  
Docteur Georges Lévy, F-69200 Venissieux (FR).

(72) Inventeurs; et:

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : CON-  
STANCIS, Alain [FR/FR]; 17, rue St Nestor, F-69008  
Lyon (FR). NICOLAS, Florence [FR/FR]; 67, rue Au-  
guste Renoir, F-69800 Saint-Priest (FR). MEYRUEIX,  
Rémi [FR/FR]; 42, rue Hector Berlioz, "Le Bois  
Saint-Rambert", F-69009 Lyon (FR). SOULA, Olivier  
[FR/FR]; 120, avenue du Carreau, F-69330 Meyzieu (FR).

(74) Mandataires : CABINET PLASSERAUD etc.; 65/67,  
rue de la Victoire, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,  
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,  
KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,  
PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,  
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,  
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,  
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: LONG-ACTING COLLOIDAL INSULIN FORMULATION AND PREPARATION THEREOF

(54) Titre : FORMULATION COLLOÏDALE D'INSULINE LONGUE ACTION ET SA PREPARATION

(57) Abstract: The invention relates to long-acting insulin injectable formulations, for the treatment of diabetes of type I and II in humans and animals. The aim of the invention is to provide a long-acting injectable insulin formulation in the form of a colloidal suspension which is stable, has a good local tolerance and toxicity compatible with chronic treatment of diabetics and which maintains a significant hypoglycemic effect, extending over at least 24 hours after a single administration, for example, by the sub-cutaneous route. Said aim is achieved by means of a stable aqueous colloidal formulation of nanoparticles of at least one poly(Leu-bloc-Glu), charged with insulin, where the pH lies between 5.8 and 7.0, the osmolarity O (in mOsmol) is  $270 \leq O \leq 800$  and the viscosity  $\nu$  (in mPa.s) is low, in other words  $\nu \leq 40$  and the nanoparticles of poly(Leu-bloc-Glu) have a mean hydrodynamic diameter Dh of  $15 \leq Dh \leq 40$ . The invention further relates to an anti-diabetic medicament based on said long-acting insulin formulation which may be injected with needles of 29G, 30G, or 31G gauge.

(57) Abrégé : L'invention concerne des formulations d'insuline longue action injectables, pour le traitement des diabètes de type I et II chez l'homme et l'animal. L'objectif essentiel de l'invention est de fournir une formulation injectable d'insuline longue action sous forme de suspension colloïdale, qui soit stable, qui présente une bonne tolérance locale et une toxicité compatibles avec le traitement chronique des diabétiques et qui maintienne un effet hypoglycémiant important s'étendant sur 24 heures au moins, après une seule administration par exemple par voie sous-cutanée. Pour atteindre cet objectif, l'invention a pour objet une formulation colloïdale, aqueuse et stable de nanoparticules d'au moins un poly(Leu-bloc-Glu), chargées en insuline, dans laquelle le pH est compris entre 5,8 et 7,0, l'osmolarité O (en mOsmol) :  $270 \leq O \leq 800$  et la viscosité  $\nu$  (en mPa.s) est faible, à savoir  $\nu \leq 40$ . Les nanoparticules du poly(Leu-bloc-Glu) ont un diamètre hydrodynamique moyen Dh tel que :  $15 \leq Dh \leq 40$ . L'invention concerne un médicament anti-diabétique à base de cette formulation d'insuline longue action et injectable sur aiguilles de gauge 29G, 30G ou 31G.

WO 2006/016078 A1

## FORMULATION COLLOÏDALE D'INSULINE LONGUE ACTION ET SA PRÉPARATION

Le domaine de la présente invention est celui des médicaments à base d'insuline, en particulier des formulations injectables d'insuline, pour le traitement des diabètes de type I et II chez l'homme et l'animal.

La présente invention concerne, plus précisément, des formulations injectables d'insuline formées par des suspensions colloïdales d'insuline destinées à une administration parentérale journalière et capables de maintenir durant tout le nyctémère chez le patient ou l'animal diabétique, une concentration d'insuline sérique voisine de la concentration basale observée chez le sujet sain.

L'invention concerne, également, des procédés de préparation desdites suspensions colloïdales d'insuline.

Les diabétiques sont assujettis à un traitement très contraignant et imparfait, les obligeant à s'injecter de l'insuline plusieurs fois par jour. Outre les injections d'insuline à absorption rapide, destinées à corriger la montée de glycémie après ou au cours d'un repas, il est également nécessaire de maintenir l'insuline sérique au niveau basal jour et nuit afin d'éviter des effets secondaires très néfastes. Cette dernière correction est particulièrement délicate car la nuit, les patients n'ont pas l'opportunité de se traiter et ainsi de rétablir le niveau souhaitable d'insuline.

Les formulations injectables d'insuline doivent être stables, à savoir que l'insuline qu'elles contiennent ne doit pas se dégrader au stockage. Elle doit par exemple être toujours pleinement efficace au terme d'un stockage de 2 ans à 5°C. Les formulations injectables d'insuline doivent avoir une rhéologie adaptée aux systèmes d'injection couramment utilisés pour l'insuline. Il existe donc un besoin aigu d'une formulation d'insuline longue action, d'une part, injectable au travers de très fines aiguilles et stable. Le problème de la mise au point d'une telle formulation est connu depuis longtemps et a fait l'objet de nombreux travaux.

Au sens du présent exposé, "insuline" désigne aussi bien l'insuline humaine ou une insuline animale ou encore un analogue de l'insuline.

Au sens du présent exposé, une « formulation d'insuline longue action » est une formulation permettant, d'une part, d'éviter, après administration, tout pic d'hypoglycémie néfaste pour le patient et, d'autre part, de maintenir une action hypoglycémiante sur 24 heures au moins.

## ART ANTERIEUR

Il est fait ci-après état d'un certain nombre de propositions techniques antérieures pour des formulations d'insuline longue action.

- 5 Ainsi, on connaît par exemple l'insuline humaine longue action NPH. Il s'agit de suspensions partiellement micro-cristallisées de complexes insuline humaine / zinc / protamine (comme décrites par exemple dans US-B-5,834,422), qui permettent de ralentir la libération in vivo de la protéine. Dans ces suspensions, l'insuline est complexée à la protamine et au zinc pour former un précipité partiellement cristallisé. Après injection
- 10 sous-cutanée, la vitesse de libération de l'insuline est contrôlée par la cinétique de dissolution in vivo de ce précipité et la cinétique de décomplexation de l'insuline. La durée d'action de ce type d'insuline, bien que prolongée par rapport à celle d'une insuline rapide, ne dépasse pas 16 heures et ne couvre donc pas réellement le nyctémère. Par ailleurs, on observe un pic d'hypoglycémie, après administration de cette insuline humaine
- 15 longue action NPH. Cette dernière n'est donc pas une véritable insuline longue action telle que définie ci-dessus.

Récemment, le brevet US-B-5,656,722 décrit une nouvelle structure de protéine analogue à l'insuline dénommée GLARGINE® incluse dans une formulation.

20

Une voie totalement différente pour obtenir une forme à libération prolongée de protéine est divulguée dans le brevet US-B- 5 904 936 (EP-B-0 734 720).

- La technique proposée ne consiste ni à modifier chimiquement l'insuline, ni encore à complexer l'insuline avec la protamine et le zinc. Il s'agit plutôt d'adsorber l'insuline
- 25 humaine sur des nanoparticules biocompatibles formées spontanément, par auto-assemblage dans l'eau de polyaminoacides amphiphiles tels que le poly(L-leucine-b-glutamate de sodium) -ci-après dénommé poly(Leu-bloc-Glu). Cet auto-assemblage conduit à une suspension colloïdale de nanoparticules. L'insuline humaine, lorsqu'elle est mise en présence d'une telle suspension colloïdale, s'adsorbe spontanément sur les
- 30 particules pour former un complexe non covalent insuline/particule. Après injection sous-cutanée, l'insuline humaine se dissocie progressivement du complexe ce qui permet de maintenir sa concentration plasmatique à une valeur voisine de sa valeur basale pendant une durée prolongée. L'avantage de cette approche est de mettre en œuvre dans un procédé non dénaturant, de l'insuline humaine non modifiée et un polymère
- 35 biocompatible, sans faire appel à des tensioactifs potentiellement dénaturants.

Il est précisé dans l'exemple 14 du brevet US-B- 5 904 936 que l'insuline humaine s'associe spontanément à des nanoparticules de poly(Leu-bloc-Glu) jusqu'à un taux maximal de 0,65 mg d'insuline humaine pour 10 mg de poly(Leu-bloc-Glu) soit 6,5 %

massique. Cette formulation d'insuline longue action injectable selon l'exemple 14 du brevet US-B- 5 904 936 est perfectible s'agissant des points suivants:

- 5       - La formulation pourrait gagner en facilité d'injection, en particulier avec des seringues à aiguilles fines 29G, 30G ou 31G. L'inconfort en résultant pour le patient est d'autant plus pénalisant qu'il s'agit d'une injection quotidienne sur plusieurs dizaines d'années.
- La formulation pourrait gagner en stabilité pour retarder encore la dégradation de l'insuline.
- 10       - L'injection sous-cutanée de cette formulation chez le cochon peut parfois conduire à la formation d'érythèmes et d'oedèmes marqués, traduisant une tolérance locale susceptible d'être améliorée, ce qui rend cette formulation difficilement compatible avec une application pharmaceutique journalière sur une très longue durée.
- La formulation est difficilement stérilisable par filtration.

15    Dans son exemple 9, la demande WO-A-01/37809 décrit une formulation d'insuline longue action injectable, dont le pH est de 7,4 et qui comprend une suspension de nanoparticules de polymère poly(Leu-bloc-Glu). Cette suspension comprend (par ml de préparation): 80 UI d'insuline et 56 mg de polymère, soit un rapport massique insuline/poly(Leu-bloc-Glu) de 5%. Administrée chez le chien Beagle à raison de 2 UI/kg, 20    cette suspension donne lieu à une libération prolongée sur 24 heures environ. Cependant, cette formulation présente une stabilité perfectible comme démontrée dans l'exemple 5 infra de la présente demande.

25    Fort de cette expérience, la demanderesse a redéfini un cahier des charges pour une formulation d'insuline humaine longue action injectable:

1. La formulation gagnerait à être plus aisément injectable au travers d'une aiguille de petit diamètre (e.g. 29G, 30G ou 31G), afin d'améliorer le confort du patient, et ainsi l'observance du traitement.
- 30    2. La formulation d'insuline est perfectible s'agissant de sa stabilité notamment à 4°C et à température ambiante, pour ne pas induire des modifications des propriétés de la formulation ni des dégradations de l'insuline humaine.
3. la formulation serait grandement améliorée si elle était dotée d'une excellente tolérance locale, afin d'être compatible avec une injection journalière sur une durée de plusieurs 35    dizaines d'années.
4. La biodisponibilité de l'insuline fournie par une telle formulation gagnerait à être aussi élevée que possible.

5. L'efficacité de la formulation, mesurée, par exemple, par son effet hypoglycémiant, gagnerait à être la plus élevée possible pendant au moins 24 heures, après l'injection.
6. La formulation gagnerait à avoir une rhéologie permettant un remplissage aisé de la seringue par le patient.
- 5 7. L'aptitude à la stérilisation par filtration serait un atout déterminant pour la formulation.

Devant cet état de fait, un objectif essentiel de la présente invention est donc de satisfaire pleinement le cahier des charges sus-décrit.

- 10 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une formulation d'insuline longue action sous forme de suspension colloïdale, qui maintienne un effet hypoglycémiant important s'étendant sur 24 heures au moins, après une seule administration, par exemple par voie sous-cutanée.

- Un autre objectif essentiel est de fournir une formulation d'insuline longue action sous
- 15 forme de suspension colloïdale, qui soit stable et qui n'induisse pas de modification de la structure et de la bioactivité de l'insuline.

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir une formulation d'insuline longue action aisément injectable au travers d'une aiguille de faible diamètre (par exemple de gauge 29G, 30G ou 31G).

- 20 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des formulations d'insuline longue action sous forme de suspensions colloïdales permettant un remplissage aisé d'une seringue au travers d'une aiguille de faible diamètre (par exemple de gauge 29G, 30G ou 31G).

- Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des formulations d'insuline longue
- 25 action sous forme de suspensions colloïdales injectables à faible volume d'injection et concentration élevée en insuline humaine, typiquement 100 IU/ml, et ce sans nuire à l'efficacité thérapeutique et en particulier à la durée de l'effet hypoglycémiant.

- Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir une formulation d'insuline longue action sous forme de suspension colloïdale, présentant une bonne
- 30 tolérance locale et une toxicité compatibles avec le traitement chronique des diabétiques.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une formulation d'insuline longue action sous forme de suspension colloïdale, dans laquelle l'insuline est une insuline humaine non modifiée.

- Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir une formulation
- 35 d'insuline longue action sous forme de suspension colloïdale comprenant des nanoparticules de poly(Leu-bloc-Glu) et qui soit filtrable sur des filtres de 0,2 µm à des fins de stérilisation.

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir une formulation d'insuline longue action sous forme de suspension colloïdale comprenant des nanoparticules de poly(Leu-bloc-Glu) sur lesquelles les protéines sont adsorbées de façon réversible, non covalente et sans dénaturation.

- 5 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension colloïdale d'insuline sous forme liquide ou sèche, qui conduise à une formulation satisfaisant aux spécifications visées ci-dessus et qui constitue une forme galénique appropriée et convenable pour une administration sous-cutanée.

- 10 Un autre objectif essentiel de l'invention est de proposer un procédé de préparation de ces suspensions colloïdales d'insuline longue action, ledit procédé se devant d'être, simple à mettre en œuvre, non dénaturant pour la protéine et devant en outre toujours assurer de façon fiable la reproductibilité des caractéristiques de la formulation.

- 15 Les objectifs ci-dessus, parmi d'autres, sont atteints par la présente invention qui concerne, tout d'abord, une formulation injectable d'insuline longue action comprenant une suspension colloïdale, aqueuse et stable de nanoparticules d'au moins un poly(L-leucine-b-L glutamate de sodium) –ci-après dénommé poly(Leu-bloc-Glu), chargées en insuline, caractérisée en ce que :

I– le pH de la formulation est tel que :

- 20  $5,8 \leq \text{pH} \leq 7,0$   
de préférence,  $6,0 \leq \text{pH} \leq 7,0$

II– l'osmolarité O (en mOsmol) de la formulation est telle que :

- 25  $250 \leq O \leq 800$   
de préférence,  $250 \leq O \leq 600$   
et plus préférentiellement encore  $270 \leq O \leq 400$

III– la viscosité  $\nu$  (en mPa.s ) de la formulation mesurée selon un mode opératoire Mv est faible, à savoir telle que:

- 30  $\nu \leq 40$   
de préférence  $\nu \leq 25$   
et plus préférentiellement encore  $\nu \leq 20$

- 35 Le fondement inventif de cette nouvelle suspension colloïdale apte à constituer une formulation galénique injectable d'insuline longue action, réside, notamment, dans la combinaison de paramètres I, II & III sélectionnés dans les fenêtres suivantes:

- une fenêtre de pH contribuant à la bonne stabilité de la suspension formant la formulation injectable d'insuline longue action selon l'invention,

- une fenêtre d'osmolarité qui assure notamment une bonne tolérance locale et une bonne aptitude à la filtration stérilisante pour la formulation,
- et une fenêtre de viscosité qui participe à l'instauration dans la formulation de propriétés rhéologiques telles qu'il est possible de remplir aisément une seringue en aspirant la formulation au travers d'une aiguille de faible diamètre (par exemple de

Un autre atout de cette nouvelle formulation est son coût raisonnable.

Enfin et surtout cette combinaison non évidente des paramètres sélectionnés I, II & III, confère à la formulation des propriétés rhéologiques telles qu'il est possible de l'injecter aisément au travers d'une aiguille de faible diamètre (par exemple de gauge 29G, 30G ou 31G).

Par ailleurs, la formulation selon l'invention possède de préférence au moins l'une (idéalement toutes) les caractéristiques suivantes :

- a. L'osmolarité O de la formulation est ajustée à l'aide d'au moins un sel monovalent ou multivalent (par exemple di ou trivalent).
- b. La concentration en poly(Leu-bloc-Glu) est inférieure à 60 mg/ml, de préférence comprise entre 10 et 55 mg/ml et, de préférence encore, comprise entre 30 et 55 mg/ml.
- c. Les particules du poly(Leu-bloc-Glu) retenu ont un diamètre hydrodynamique moyen Dh exprimé en nanomètres (nm) et mesuré selon un mode opératoire Md, tel que :

$$10 \leq Dh \leq 150$$

de préférence,  $20 \leq Dh \leq 100$

- d. Le rapport massique insuline/poly(Leu-bloc-Glu), exprimé en %, est tel que :

$$3 \leq \text{insuline/poly(Leu-bloc-Glu)},$$

de préférence,  $5 \leq \text{insuline/poly(Leu-bloc-Glu)} \leq 11$ .

- e. Le taux maximal de chargement Ta des nanoparticules avec l'insuline, exprimé en % de masse d'insuline associée par rapport à la masse de poly(Leu-bloc-Glu et mesuré selon un mode opératoire Ma, est tel que :

$$10 \leq Ta$$

de préférence,  $10 \leq Ta \leq 40$

et, plus préférentiellement encore,  $12 \leq Ta \leq 25$ .

f. L'insuline est une insuline humaine non modifiée.

Finalement, la formulation injectable d'insuline longue action selon l'invention est dotée des propriétés essentielles suivantes:

- 5       ♦ une bonne aptitude au remplissage d'une seringue par aspiration au travers d'une aiguille de faible diamètre;
- ♦ une "injectabilité" aisée au travers d'une aiguille de faible diamètre, ce qui améliore considérablement le confort du patient et accroît donc l'observance du traitement;
- 10       ♦ une excellente stabilité;
- ♦ une bonne tolérance locale;
- ♦ une activité hypoglycémiant étendue sur 24 heures après administration chez l'homme d'une dose standard de 0,6 UI/kg;
- ♦ une aptitude à la filtration stérilisante sur 0,2 micron, grâce à la petite taille des
- 15       particules.

Cette suspension présente en outre :

- un faible rapport massique polymère/insuline conduisant à un surcoût limité en polymère ;
- 20   - une gamme de taille de particules qui assure une bonne tolérance locale et une bonne aptitude à la filtration stérilisante; et
- une gamme de concentration en polymère BLE qui permet d'une part de maintenir la durée de l'effet hypoglycémiant sur 24 heures au moins, tout en permettant une
- injection aisée.

25

## DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

- La sélection de ces paramètres pour obtenir une suspension colloïdale d'insuline adaptée
- 30 en tant que formulation médicamenteuse injectable d'insuline longue action, est le fruit d'importantes et longues recherches sur la mesure et la comparaison des activités pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de ces formulations d'insuline sur divers modèles animaux ainsi que de nombreux travaux sur "l'injectabilité", la stabilité, la tolérance et la biocompatibilité de cette suspension particulière, ainsi que sur son caractère
- 35 injectable, et son aptitude à être aspirée au travers d'une aiguille .



La suspension colloïdale stable formant la formulation comporte des nanoparticules structurées submicroniques, constituées par auto assemblage d'un copolymère poly(Leu-bloc-Glu).

Elles sont aptes :

- 5           o à associer (adsorber) spontanément l'insuline, de façon non covalente, en suspension colloïdale, à l'état non dissous et sans dénaturation, pour former un complexe nanoparticule/insuline,
- o et à libérer celle-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée.

Enfin, elles sont stables en phase aqueuse en l'absence de tensioactif(s).

10

La suspension colloïdale de nanoparticules selon l'invention résulte d'une sélection particulière parmi celles décrites de manière générale dans le WO-A-01/37809. Cette sélection particulière a été trouvée après de nombreux essais visant à optimiser les exigences contradictoires du cahier des charges mentionné supra.

15

Les inventeurs ont dû conduire de longs et de nombreux essais pour procéder à la sélection particulière de paramètres permettant de mettre au point une formulation, à savoir une suspension remplissant le cahier des charges susvisé.

- 20 L'optimisation de la stabilité de la suspension passe par un ajustement du pH de la suspension entre 5,8 et 7,0, de préférence entre 6,0 et 7,0 et, plus préférentiellement encore inférieur à 7,4. La stabilité dont il est question est, d'une part, une stabilité physicochimique de la suspension colloïdale de nanoparticules de poly(Leu-Bloc-Glu) et, d'autre part, une stabilité de l'actif insulinique en termes d'efficacité thérapeutique
- 25 (contrôle de la glycémie). Avantageusement la formulation reste stable après un stockage de 2 ans à 5 °C, par exemple.

- L'aptitude remarquable de la formulation de l'invention à être facilement injectable au travers d'une aiguille de petit diamètre (par exemple gauge 29G, 30G & 31G ou diamètre :
- 30 0,15 à 0,4 mm, longueur : 8 à 20 mm) est appréciée notamment au travers de la force à exercer sur le piston de la seringue. Il est par exemple souhaitable que cette force n'excède pas une valeur raisonnable, e.g. de l'ordre de 40 newtons, de préférence de l'ordre de 30 Newtons, et que le débit ne soit pas inférieur ou égal à 1ml/min. De façon surprenante, la viscosité mesurée à bas gradient de cisaillement (mesurée selon le mode opératoire Mv
- 35 décrit ci-après) ne contrôle pas totalement la force nécessaire pour injecter la suspension colloïdale au travers d'une aiguille de faible diamètre. Il est du mérite de la Demanderesse d'avoir montré que la force à appliquer pour l'injection est d'autant plus faible que la concentration en poly(Leu-bloc-Glu) est basse. Idéalement, la concentration en poly(Leu-

bloc-Glu) peut être ajustée, conformément à l'invention, afin d'optimiser le compromis entre la durée d'action et le caractère injectable de la suspension. Cet optimum est obtenu pour une concentration en polymère comprise entre 10 et 60 mg/ml, de préférence entre 20 et 55 mg/ml.

5

La possibilité de remplir aisément la seringue par aspiration de la formulation au travers d'aiguilles de petit diamètre (par exemple gauge 29G, 30G & 31G ou diamètre : 0,15 à 0,4 mm, longueur : 8 à 20 mm) est également une caractéristique visée. Cette opération doit, par exemple, être typiquement réalisée dans un temps  $\leq 120$  s, de préférence  $\leq 60$  s et plus préférentiellement encore  $\leq 30$  s, pour un volume de 500  $\mu$ l.

10

Il est du mérite des inventeurs d'avoir établi que, contrairement à ce qui a été montré s'agissant de "l'injectabilité" de la formulation formée par une suspension colloïdale de nanoparticules, la capacité de cette formulation à permettre un remplissage rapide d'une seringue, dépend de façon importante- de la viscosité (mesurée selon le mode opératoire Mv décrit infra) de la suspension. Un remplissage rapide satisfaisant les conditions énoncées ci dessus, est obtenu lorsque la viscosité  $\eta$  (mesurée selon le mode opératoire Mv décrit infra) est  $\leq$  à 40 mPa.s, de préférence  $\leq 25$  mPa.s et, plus préférentiellement encore  $\leq 20$  mPa.s, voire en pratique  $\leq 15$  mPa.s, par exemple.

15

## 20 Mode Opératoire Mv

Conformément à la présente invention, la détermination du paramètre important qu'est la viscosité  $\eta$  (en mPa.s à 20°C) peut être réalisée, par exemple, à 20°C à l'aide d'un rhéomètre AR1000 (TA Instruments) équipé d'une géométrie cône-plan (4 cm, 2°). La viscosité  $\eta$  est mesurée pour un gradient de cisaillement de 10  $s^{-1}$ .

25

Un autre mérite des inventeurs est d'avoir trouver un moyen de réduction de la viscosité, par ajustement de l'osmolarité O (en mOsm) de la suspension à une valeur comprise entre 270 et 800, de préférence entre 270 et 600 et plus préférentiellement encore entre 270 et 400.

30

De préférence, cet ajustement de l'osmolarité est effectué par ajout d'au moins un sel, et plus spécialement d'un ou plusieurs sels monovalents et/ou multivalents (e.g. divalents ou trivalents), plutôt que par ajout de molécules neutres comme le glycérol, le saccharose ou autres molécules polyhydroxylées. Ces sels peuvent être, par exemple, choisis dans les familles suivantes : chlorure de sodium, chlorure de potassium, chlorure de zinc, mono ou dihydrogénophosphate de sodium ou de potassium, chlorure de magnésium ou de calcium, citrate de sodium, sulfate de sodium, sulfate de potassium ou tout autre sel connu de l'homme de l'art et apte à être injecté par voie sous cutanée.

35

Suivant une caractéristique remarquable de l'invention, les sels multivalents sont des candidats privilégiés pour l'ajustement de l'osmolarité, étant donné qu'ils ont un effet fluidifiant plus marqué que les sels monovalents.

- 5   Avantageusement, ces sels multivalents sont par exemple sélectionnés dans le groupe comprenant: le chlorure de zinc, le chlorure de magnésium, le chlorure de calcium, le phosphate disodique, le citrate de sodium, le citrate de potassium, le sulfate de sodium ou le sulfate de potassium et leurs mélanges.
- 10   Conformément à l'invention, les nanoparticules ont une petite taille et présentent plus précisément un diamètre hydrodynamique  $D_h$ , mesuré selon le mode opératoire Md, tel que (en nm) dans l'ordre croissant de préférence :  $10 \leq D_h \leq 150$ ;  $10 \leq D_h \leq 100$ ;  $20 \leq D_h \leq 100$ ;  $10 \leq D_h \leq 50$ ,  $15 \leq D_h \leq 40$ .
- 15   L'une des incidences parmi d'autres de ces choix de taille de particules de poly(Leu-bloc-Glu) est que la formulation selon l'invention est aisément filtrable sur un filtre stérilisant de 0,2  $\mu\text{m}$  de taille de pores, ce qui permet d'obtenir, aisément et à moindre coût, une formulation injectable stérile. Par ailleurs, il apparaît que de façon surprenante, la tolérance locale de ces particules est meilleure que celle de plus grande taille, comme démontré ci-après dans les exemples.
- 20

#### Mode opératoire Md :

- La poudre pulvérulente de poly(Leu-bloc-Glu) est mise en suspension dans l'eau à une concentration d'environ 50 g/l et est laissée à agiter une nuit à 25°C . Elle est ensuite
- 25   diluée à l'aide d'une solution aqueuse de chlorure de sodium 0,15 M, de façon à obtenir au final une concentration en poly(Leu-bloc-Glu) comprise entre 0,01 et 0,5 g/l et, de préférence, égale à 0,2 g/l. Cette suspension est agitée 1 heure, puis introduite dans la cellule de diffusion d'un appareil de diffusion de la lumière, de type Brookhaven, fonctionnant avec un faisceau laser de longueur d'onde 488 nm et polarisé verticalement.
- 30   Le diamètre hydrodynamique est calculé à partir de la fonction d'autocorrélation du champ électrique par le méthode des cumulants, comme décrit dans l'ouvrage « Surfactant Science Series » volume 22, Surfactant Solutions, Ed. R. Zana, chap. 3, M. Dekker, 1984.

- Suivant une autre caractéristique préférée, les poly(Leu-bloc-Glu) sélectionnés
- 35   conformément à l'invention, présentent la caractéristique suivante :
- le taux maximal de chargement  $T_a$  des nanoparticules avec l'insuline, exprimé en % de masse d'insuline associée par rapport à la masse poly(Leu-bloc-Glu) et mesuré selon un mode opératoire Ma, est tel que :
- $10 \leq T_a$

de préférence,  $10 \leq T_a \leq 40$   
et, plus préférentiellement encore,  $12 \leq T_a \leq 25$ .

### Mode opératoire Ma :

- 5 (a) Préparation de solutions aqueuses d'insuline : de l'insuline recombinante humaine lyophilisée est versée dans un volume V de solution d'acide chlorhydrique 0.01 N durant au maximum 15 min. Cette solution est ensuite versée dans un même volume V de solution NaOH 0.01 N. Le pH est ajusté entre 7.2 et 7.4 avec une solution de soude 1 N. La solution est agitée doucement pendant 30 min. La masse d'insuline et  
10 le volume V sont calculés en fonction du volume V' souhaité de solution finale afin d'obtenir des concentrations en insuline de 100 UI/ml, 120 UI/ml et 140 UI/ml.
- (b) Préparation de la formulation d'insuline. Le poly(Leu-bloc-Glu) lyophilisé est ajouté aux solutions d'insuline à raison de 11 mg/ml. Ces mélanges sont dégazés puis placés dans un agitateur à basculement à 25°C pendant 2 heures puis dégazés de nouveau.  
15 Le pH est ajusté entre 7.2 et 7.4 avec une solution HCl 1N et les mélanges sont agités (agitateur à basculement) pendant une nuit à température ambiante.
- (c) Dosage de l'insuline libre : les formulations sont injectées sur une colonne de chromatographie liquide d'exclusion stérique dans des conditions non dissociantes et l'insuline libre est dosée par fluorimétrie.

20

Suivant une variante avantageuse, l'insuline associée aux nanoparticules dans la suspension constituant la formulation de l'invention est une insuline non modifiée.

Au sens de l'invention, une insuline non modifiée est une insuline recombinante ou non, n'ayant subi aucune transformation de sa structure primaire, ni aucune modification des  
25 groupements latéraux des acides aminés.

Avantageusement, la suspension constituant la formulation de l'invention comprend au moins un conservateur, de préférence sélectionné dans le groupe comprenant : les phénols, les crésols (e.g méta-crésol), le parahydroxybenzoate de méthyle, de propyle, de butyle, ou  
30 tout autre conservateur connu de l'homme de l'art (consulter par exemple l'article de L.A. Gatlin et al. in *Injectable Drug Development*, P.K.Gupta eds Interpharm Press, Denver Colorado, 1999), et leurs mélanges.

Le procédé de synthèse du poly(Leu-bloc-Glu) ainsi que le procédé d'obtention des  
35 nanoparticules de poly(Leu-bloc-Glu) en suspension aqueuse s'effectuent, de préférence, selon les modalités et les recommandations décrites dans le WO-A-01/37809.

Au lieu d'être en suspension stable en milieu liquide aqueux, les nanoparticules de poly(Leu-bloc-Glu) chargées en insuline pourraient également exister dans un état solide stable, de préférence sous forme pulvérulente. Ainsi, la présente invention concerne également un solide -de préférence pulvérulent-, caractérisé en ce qu'il comprend des nanoparticules de poly(Leu-bloc-Glu) chargées en insuline et en ce qu'il est obtenu à partir de la suspension liquide qui est définie ci-dessus et qui constitue la formulation de l'invention. Cette obtention est effectuée par tout moyen connu et approprié tel que la lyophilisation, l'atomisation ou le séchage.

- 5
- 10 Le procédé de préparation de la formulation liquide injectable d'insuline longue action fait intervenir du poly(Leu-bloc-Glu) non chargé en insuline et consiste essentiellement à mettre en suspension, en milieu liquide aqueux, au moins un poly(Leu-bloc-Glu) et de l'insuline, de préférence sous agitation, à ajouter éventuellement des excipients, au besoin à ajuster le pH à une valeur comprise entre 5,8 et 7,0 et, éventuellement à filtrer sur des pores de taille 0,2  $\mu$ m la suspension ainsi obtenue.
- 15

Pour effectuer l'association de l'insuline aux nanoparticules, il est possible de mettre en œuvre plusieurs méthodes, dont des exemples non limitatifs sont donnés ci-après.

- 20 Selon une première méthode, on effectue l'association de l'insuline aux particules par mise en présence d'une phase aqueuse contenant l'insuline avec la suspension colloïdale de nanoparticules de poly(Leu-bloc-Glu). De façon plus précise : une suspension de nanoparticules à pH neutre et isotonique est reconstituée à une concentration de 60 mg/ml ou plus (selon la concentration voulue dans la suspension finale). Une solution d'insuline concentrée (typiquement entre 500 et 600 UI/ml – pH compris entre 7 et 8 - isotonique) est alors préparée extemporanément à partir de poudre d'insuline (dissolution en milieu acide puis neutralisation). Les deux solutions sont mélangées par agitation pendant quelques minutes et cette phase est éventuellement suivie d'une phase de « maturation » de quelques heures. Le pH est ensuite ajusté à une valeur comprise entre 5,8 et 7,0.
- 25

- 30 Selon une deuxième méthode, il s'agit essentiellement de mettre en présence (en les mélangeant) le poly(Leu-bloc-Glu) à l'état pulvérulent avec une phase aqueuse contenant l'insuline e.g. à une concentration entre 100 et 200 UI/ml.

- Il importe de veiller au respect de l'une des caractéristiques essentielles de l'invention, à savoir l'établissement d'un pH compris entre 5,8 et 7,0, de préférence entre 6,0 et 7,0. Ce facteur participe de façon importante à la stabilité et à la tolérance locale de la suspension de nanoparticules de poly(Leu-bloc-Glu). L'ajustement du pH peut s'effectuer par tout moyen connu et approprié, à savoir notamment par acidification, par exemple, de la façon suivante :
- 35

- 1- ajout d'acide chlorhydrique 0,1N dans la suspension chargée d'insuline (il se produit alors une précipitation intermédiaire qui disparaît au bout d'une heure d'agitation environ)
  - 2- ajout d'acide acétique 0,1N dans la suspension chargée d'insuline (pas de précipitation intermédiaire)
- 5 L'ajout -2- d'acide acétique est préféré.

Lors de la préparation de la formulation selon l'invention, on peut éventuellement ajouter des excipients, et au besoin réajuster le pH à une valeur comprise entre 5,8 et 7,0, et, éventuellement stériliser la suspension ainsi obtenue par filtration sur des pores de 0,2 microns.

10

Ces autres excipients peuvent être notamment au moins un conservateur, de préférence sélectionné dans le groupe comprenant : les phénols, les crésols (e.g méta-crésol), les parahydroxybenzoates de méthyle, de propyle, ou de butyle, ou tout autre conservateur connu de l'homme de l'art (consulter par exemple l'article de L.A. Gatlin et al. in *Injectable Drug Development*, P.K.Gupta eds Interpharm Press, Denver Colorado, 1999), et leurs mélanges.

15

Les conditions de mélange aussi bien pour la régulation du pH que pour l'addition d'excipients, sont classiques et à la portée de l'homme du métier notamment en termes de température, pression et agitation.

20

Finalement, la suspension liquide peut être transformée en un solide pulvérulent par toute méthode classique connue de l'homme de l'art, telle que par exemple la lyophilisation, l'atomisation ou le séchage.

25

Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne les applications pharmaceutiques et vétérinaires de la suspension poly(Leu-bloc-Glu)-insuline. L'application essentielle est le traitement du diabète, et plus précisément du diabète de type I et II.

30

Ainsi, l'invention a également pour objet un médicament caractérisé en ce qu'il comprend de la formulation comprenant une suspension colloïdale poly(Leu-bloc-Glu)-insuline, cette formulation étant telle que définie ci-dessus et/ou de la formulation obtenue par le procédé lui aussi décrit supra et/ou du solide pulvérulent tel défini ci-dessus.

35

Il s'agit de préférence d'un médicament destiné au traitement du diabète et plus précisément du diabète de type I et II.

Suivant une disposition avantageuse de l'invention, le médicament qu'elle concerne est assimilable à une formulation liquide injectable d'insuline humaine longue action susceptible d'assurer au patient diabétique, après une injection sous-cutanée, une concentration basale en insuline, pendant au moins 24 heures, en régime d'injections  
5 répétées.

La concentration basale d'insuline doit s'entendre dans le présent exposé comme une concentration typique dans le sang observée chez l'individu sain, soit 30 picomoles/l.

10 L'invention concerne en outre une méthode de traitement du diabète, en particulier du diabète de type I et II, caractérisée en ce qu'elle consiste essentiellement à administrer au patient le médicament susvisé à base d'une formulation comprenant une suspension colloïdale aqueuse stable de nanoparticules de poly(Leu-bloc-Glu) chargées en insuline, de préférence non modifiée.

15

Il s'agit préférentiellement d'une administration journalière par injection de préférence sous-cutanée.

20 Le médicament selon l'invention peut également se présenter sous la forme d'un solide pulvérulent décrit ci-avant et, éventuellement du liquide aqueux pour la préparation de la suspension.

Il en résulte que l'invention couvre également une présentation galénique comprenant, d'une part, du solide pulvérulent tel que défini supra et, d'autre part, de manière séparée, du liquide aqueux pour la reconstitution, avant l'administration, de la suspension  
25 constituant la formulation selon l'invention.

Les exemples qui suivent permettront de mieux comprendre l'invention dans ses différents aspects produit/procédé/application. Ces exemples illustrent la préparation de la formulation selon l'invention à base de suspension de nanoparticules de poly(Leu-bloc-  
30 Glu) chargées en insuline, de même qu'ils présentent les caractéristiques de structure et les propriétés de cette formulation, en la comparant avec des formulations poly(Leu-bloc-Glu)-insuline selon l'art antérieur.

## EXEMPLES

### Exemple 1 - Synthèse d'un poly(Leu-bloc-Glu) 25/35 dibloc

- 5 Dans un réacteur de 0,5 litre thermostaté à 30°C, on introduit sous agitation 38,9 g de NCA-GluOMe (0,208 mole) et 156 g de N-Méthyl Pyrrolidine-one-2 (NMP). Après dissolution, on ajoute 5,78 g d'une solution d'ammoniac 0,452 M dans le méthanol (1,25 % molaire/NCA). La polymérisation est suivie par mesure de dioxyde de carbone dégagé dans une cloche à gaz et vérifiée par disparition des bandes de vibration caractéristiques
- 10 des NCA à 1860 et 1790 cm<sup>-1</sup>. Après 30 min, on introduit une solution de 23,3 g de NCA Leucine (0,149 mole) dans 5 219 g de NMP. Après 10 min de réaction, la température est augmentée à 60°C. La polymérisation est suivie comme précédemment. Elle est complète après 1-2 heures. La température du mélange réactionnel obtenu précédemment est augmentée à 80°C. 42,0 g d'acide chlorhydrique aqueux (35 % de la masse) sont ajoutés
- 15 au milieu réactionnel sous agitation mécanique en 30 min. Le réacteur est alors mis sous pression réduite réglée à 600 mbar pendant 6 heures. Un mélange de 42,0 g d'acide chlorhydrique 35 % et de 167,9 g d'eau est alors ajouté sur 60 min, suivi d'une deuxième phase de vide à 250 mbar pendant 18 heures. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à 50°C, puis neutralisé par la soude aqueuse (35% de la masse). La NMP et le chlorure de
- 20 sodium formé lors de la neutralisation, sont éliminés par diafiltration contre 20 volumes d'eau Milli Q, sur membrane de MWCO de 1000 Daltons (système Pellicon II, Millipore). On obtient une suspension colloïdale aqueuse stable de nanoparticules de vectorisation. La suspension de nanoparticules est finalement lyophilisée.
- Les teneurs en motifs leucine sont déterminées par résonance magnétique nucléaire du
- 25 proton (signaux à 2,10, 2,22 et 2,58 ppm pour 4H du Glu et à 0,85 ppm pour 6H du Leu).

### Exemple 2 - Synthèse d'un poly(Leu-bloc-Glu) 25/70 dibloc

- 30 146,4 g de NCA GluOMe sont dissous dans 586 g de NMP auxquels sont ajoutés 18,43 g d'une solution d'ammoniac 0,48 M dans le méthanol. Lorsque la polymérisation des NCA GluOMe est complète, une solution de 43,9 g de NCA Leu dans 708 g de NMP est introduite et la polymérisation des NCA Leu est poursuivie jusqu'à disparition des monomères. Le milieu est alors porté à 80°C et on y ajoute, en goutte à goutte, durant
- 35 30 min à 1 heure, 129,4 g d'HCl 35 %. Un vide de 600 mbar est appliqué pendant 6 heures, puis 129,4 g d'HCl 35 % supplémentaires sont ajoutés en mélange avec 517,5 g d'eau. Un vide de 250 mbar est alors appliqué pendant 18 heures. Après cette étape, la température est réduite à 50°C, 1 litre d'eau est introduit, suivi de 280 ml de NaOH 35 %



pour ramener le pH à 7,4. La suspension est ensuite filtrée (5 µm), dialysée (seuil de coupure 1 000 Da) dans de l'eau, pour éliminer le solvant et les sels, et enfin filtrée (0,22 µm). Cette suspension peut être utilisée directement ou subir des traitements ultérieurs, tels que la distillation de l'eau ou la lyophilisation

5

### **Exemple 3 – Préparation d'une suspension d'insuline longue action selon l'invention**

#### **3.1- préparation d'une suspension colloïdale de nanoparticules de poly(L leucine bloc 10 L glutamate de sodium) (P) intermédiaire concentrée à 60 mg/g :**

La préparation de la suspension est faite sous hotte à flux laminaire ou en pièce stérile.

Dans un flacon de verre de 3 l, on introduit successivement 50 g de polymère poly(Leu-bloc-Glu) selon l'exemple 2 sous forme lyophilisée (contenant 1 % d'eau environ) et 757 g d'eau PPI (préparation pour injectable). La suspension est agitée de manière  
15 énergétique à l'aide d'un barreau magnétique pendant au moins 12 heures. Un vide limité (50-100 mbar) est réalisé dans le flacon. 10,6 g de NaCl 30% et 6,7 g de NaOH 1N sont ajoutés à la solution pour ajuster le pH à 7,2 et l'osmolarité à 300 mOsm et régler la concentration en polymère à 60 mg/ml.

#### **20 3.2- préparation d'une solution d'insuline intermédiaire à 590 UI/ml :**

4,5 g d'insuline humaine recombinante (poudre) d'activité 28,4 UI/g et contenant 7,7% d'humidité sont introduits dans un flacon en verre, 181 g d'eau sont rajoutés et l'insuline est dispersée sous agitation magnétique lente. 4,0 g d'HCl 1N sont ajoutés jusqu'à  
25 obtention d'une solution limpide d'insuline acide. 5,6 g de soude 1N sont alors ajoutés de façon à obtenir une solution finale ayant un pH compris entre 7 et 8. 6,1 g de NaCl 30% sont ajoutés pour ajuster l'osmolarité.

La solution est filtrée sur membrane polyéthersulfone 0,2µm avant mélange avec la suspension de NPs.

#### **30 3.3 - préparation d'une solution d'excipients (phénol 140 mM ; m-crésol 140 mM, acide acétique 0,1N) :**

Dans un flacon de 1 l on rajoute successivement :

- 13,2 g de phénol (M=94 g/mol)
- 100 g d'eau
- 35 - 15,1 g de m-crésol (M=108 g/mol)
- 100 g d'acide acétique 1N
- 771,7 g d'eau.

La solution est agitée au moins une demi-heure jusqu'à obtention d'une solution limpide puis filtrée sur membrane 0.2  $\mu\text{m}$  PVDF ou PTFE.

### 3.4- préparation d'une suspension colloïdale d'insuline longue action A :

- 5 (Osmolarité O = 300 mOsm; pH=6.5; Concentration en poly(Leu-bloc-Glu) Cpol = 42 mg/ml; Concentration en insuline C insulin = 3.5 mg/ml)  
800 g de suspension P sont introduits dans un flacon de 1 litre.  
Sous agitation magnétique lente, 196 g de solution à 590 UI/ml d'insuline sont rajoutés. L'agitation est maintenue pendant ¼ heure puis le mélange est laissé au repos à 25°C  
10 pendant une nuit. 171 g de solution d'excipients sont alors rajoutés au mélange et la solution est laissée à agiter pendant 4 heures. La formulation ainsi obtenue est filtrée sur membrane polyéthersulfone 0,2  $\mu\text{m}$ .

### 15 Exemple 4 – Viscosités et diamètres hydrodynamiques de la suspension d'insuline longue action A selon l'invention

- Les mesures de viscosité sont réalisées à 20°C sur un rhéomètre AR1000 (TA Instruments) équipé d'une géométrie cône-plan (4cm, 2°). La viscosité est mesurée pour  
20 un gradient de cisaillement de 10 s<sup>-1</sup>.

On trouve une viscosité de 25 mPa.s.

Le diamètre hydrodynamique des particules des suspensions H, M et L , mesuré selon le mode opératoire Md., est de 35 nm.

25

### Exemple 5 - Stabilités comparées des suspensions d'insuline longue action à différents pH

Une première suspension pharmaceutique M d'insuline, contenant :

- 30
- 100 UI/ml d'insuline recombinante humaine
  - 42 mg/ml du polymère poly(Leu-bloc-Glu) selon l'exemple 1
  - 21 mM de phénol et de méta-crésol

est préparée selon l'exemple 3 ci-dessus. Son pH est ajusté à pH 6,5 +0,1 et son osmolarité est de 300+/-20 mOsmol.

35

Une deuxième suspension pharmaceutique comparative, Comp1, d'insuline longue action, identique à la composition M est préparée de la même façon. Mais à la différence de la suspension selon l'invention, son pH est ajusté à 7,2 +/-0,1. L'osmolarité O est également de 300+/-20 mOsmol.

- 5 Les suspensions pharmaceutiques M et Comp1 sont mises en stabilité accélérée à 37°C. Le suivi de stabilité est effectué en mesurant en fonction du temps le pH, l'osmolarité, le diamètre hydrodynamique des nanoparticules chargées en insuline et la quantité d'insuline non dénaturée dans chacune des préparations A et B.
- 10 Afin de doser l'insuline dans les préparations M et Comp1, 0,1 ml de préparation sont dissous dans 2 ml d'acide trifluoroacétique (TFA). La solution est ensuite injectée dans une colonne C8 Biobasic® pour analyse HPLC de la protéine. On parvient ainsi à doser l'insuline non dénaturée dans la préparation. La péremption de la préparation est atteinte lorsque le taux d'insuline non dénaturée descend en dessous de 95%.

15

Pour les deux préparations M et Comp1, le pH, l'osmolarité et le diamètre des nanoparticules sont stables comme le montre le tableau ci-dessous :

- 20 Le tableau 1 ci-après montre l'évolution du pH, de l'osmolarité et du diamètre hydrodynamique des particules et du % d'insuline humaine non dénaturée pour les formulations M (pH 6,5) et Comp 1 (pH 7,4).

TABLEAU 1

Temps(jour)	0	7	21
<b>pH</b>			
<b>M</b>	6,5	6,3	6,5
<b>Comp1</b>	7,2	7,3	7,2
<b>Osmolarité O (mOsmol)</b>			
<b>M</b>	303	301	305
<b>Comp1</b>	297	302	301
<b>Diamètre hydrodynamique (nm)</b>			
<b>M</b>	36	34	35
<b>Comp1</b>	35	35	34
<b>% insuline non dénaturée</b>			
<b>M</b>	100	98	96
<b>Comp1</b>	100	95	86

On constate que la suspension M selon l'invention maintenue à pH 6,5 présente, dans ces conditions de test accéléré, une excellente stabilité puisque 95% de l'insuline est encore non dénaturée après 21 jours. En revanche, pour la formulation Comp1 à pH 7,2, la quantité d'insuline non dénaturée descend au-dessous de 95% dès  $t = 7$  jours. Ainsi, de façon surprenante, la stabilité de l'insuline dans les préparations d'insuline longue action selon la présente invention, est remarquablement bonne à pH légèrement acide.

**Exemple 6 - Comparaison de la tolérance locale d'une suspension d'insuline longue action selon l'invention et d'une suspension d'insuline longue action à base d'un poly(Leu-bloc-Glu) selon WO-A-01/37809 et n'appartenant pas à la sélection selon l'invention**

Une étude a été réalisée de manière à comparer la tolérance locale de la suspension H selon l'invention, correspondant à l'exemple 3 ci-dessus et d'une formulation à pH neutre d'un poly(Leu-bloc-Glu) n'appartenant pas à la sélection selon l'invention.

La suspension M selon l'invention comprend:

- 100 UI/ml d'insuline recombinante humaine
- 42 mg/ml du polymère poly(Leu-bloc-Glu) selon l'exemple 3
- 21 mM de phénol et de métacrésol

et est préparée selon l'exemple 3 ci-dessus. Son pH est ajusté à pH 6,5  $\pm$  0,1.

Une suspension Comp2 comparative, n'appartenant pas à l'invention, est préparée à partir d'un copolyaminoacide poly(Leu-bloc-Glu) selon le WO-A-01/37809. Elle comprend :

- 100 UI/ml d'insuline recombinante humaine
- 100 mg/ml d'un poly(L leucine bloc L glutamate de sodium) formé de 40 unités de leucine et de 60 unités de glutamate de sodium. Le diamètre hydrodynamique des particules est de 80 nm.

Cette formulation Comp2 est préparée selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 3 ci-dessus. Son pH est ajusté à pH 7,4  $\pm$  0,1.

Les suspensions M et Comp2 ci-dessus et une solution de NaCl 0.9 % (référence négative) ont été injectées en sous-cutané, sous un volume de 0,50 ml, sur la peau du ventre de 9 porcs domestiques.

Les signes cliniques – érythème et œdème – ont été évalués durant les trois jours qui suivent l'injection.

La référence négative (NaCl) n'a pas provoqué de réaction clinique.

La préparation Comp2 a provoqué une réaction locale allant en augmentant jusqu'à 24 heures. A ce stade, elle se caractérise par un érythème et un œdème cotés modéré à marqué. La réaction disparaît en 3 jours environ.

5

La préparation M a induit une réaction locale très légère et transitoire. Quelques animaux présentent un érythème très léger à 12 et 24 heures, et un très léger œdème est généralement observé jusqu'à 24 heures.

- 10 Ainsi, la tolérance locale de la suspension M selon l'invention est notablement meilleure que celle de la suspension Comp2.

Contrairement à Comp2, la suspension M selon l'invention permet donc l'administration quotidienne du médicament.

15

#### **Exemple 7 - Temps de remplissage d'une formulation A selon l'invention**

- 20 Le temps de remplissage d'une seringue au travers d'une aiguille de gauge 29 et de longueur 8 mm est mesuré pour des valeurs croissantes de l'osmolarité.

La suspension selon l'invention est préparée selon l'exemple 3. Son pH est de 6,5 et sa concentration de 43 mg/ml.

Le volume de remplissage est de 0,5 ml.

L'osmolarité O de la suspension est réglée par ajouts dosés de NaCl.

- 25 On obtient les résultats suivants présentés dans le tableau 2 ci-dessous:

TABLEAU 2

Osmolarité O (mOsmol)	Temps de remplissage (s)
120	Remplissage impossible
200	180
300	90
600	50

- 30 Le réglage de l'osmolarité O selon l'invention permet ainsi de ramener le temps de remplissage d'une seringue à un temps suffisamment court pour permettre aisément un usage quotidien par les patients.

## REVENDICATIONS

- 1 – Formulation injectable d'insuline longue action comprenant une suspension colloïdale, aqueuse et stable de nanoparticules d'au moins un poly(L-leucine-b-L glutamate de sodium) –ci-après dénommé poly(Leu-bloc-Glu), chargées en insuline, caractérisée en ce que :

I– le pH de la formulation est tel que :

$$5,8 \leq \text{pH} \leq 7,0$$

de préférence,  $6,0 \leq \text{pH} \leq 7,0$

10

II– l'osmolarité O (en mOsmol) de la formulation est telle que :

$$270 \leq O \leq 800$$

de préférence,  $270 \leq O \leq 600$

et plus préférentiellement encore  $270 \leq O \leq 400$

15

III – la viscosité v (en mPa.s ) de la formulation mesurée selon un mode opératoire Mv est faible, à savoir telle que:

$$v \leq 40$$

de préférence

$$v \leq 25$$

20

et plus préférentiellement encore

$$v \leq 20$$

2 – Formulation selon la revendication 1, caractérisée en ce que son osmolarité O est ajustée à l'aide d'au moins un sel monovalent ou multivalent.

- 25 3 – Formulation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la concentration en poly(Leu-bloc-Glu) est inférieure à 60 mg/ml, de préférence comprise entre 10 et 55 mg/ml et de préférence encore comprise entre 30 et 55 mg/ml.

- 30 4 – Formulation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que les particules du poly(Leu-bloc-Glu) retenu ont un diamètre hydrodynamique moyen Dh exprimé en nanomètres (nm) et mesuré selon un mode opératoire Md, tel que :

$$10 \leq D_h \leq 150$$

de préférence,  $20 \leq D_h \leq 100$

- 35 5 – Formulation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le rapport massique insuline/poly(Leu-bloc-Glu), exprimé en %, est tel que :

$$3 \leq \text{insuline/poly(Leu-bloc-Glu)},$$

de préférence,  $5 \leq \text{insuline/poly(Leu-bloc-Glu)} \leq 11$ .

- 6 – Formulation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le taux maximal de chargement  $T_a$  des nanoparticules avec l'insuline, exprimé en % de masse d'insuline associée par rapport à la masse de poly(Leu-bloc-Glu) et mesuré selon un mode opératoire  $M_a$ , est tel que :

$$10 \leq T_a$$

de préférence,  $10 \leq T_a \leq 40$

et, plus préférentiellement encore,  $12 \leq T_a \leq 25$ .

- 7 – Formulation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'insuline est une insuline humaine non modifiée.

- 8 – Formulation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un conservateur, de préférence sélectionné dans le groupe comprenant : les phénols, les crésols (e.g méta-crésol), les parahydroxybenzoates de méthyle, de propyle, ou de butyle et leurs mélanges.

- 9 – Solide pulvérulent caractérisé en ce qu'il comprend des nanoparticules de poly(Leu-bloc-Glu) chargées en insuline et en ce qu'il est obtenu à partir de la formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

- 10 – Procédé de préparation de la formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à mélanger, en milieu liquide aqueux, au moins un poly(Leu-bloc-Glu) et de l'insuline, de préférence sous agitation, à ajouter éventuellement des excipients, au besoin à ajuster le pH à une valeur comprise entre 5,8 et 7,0 et, éventuellement à filtrer la suspension ainsi obtenue.

- 11 – Procédé de préparation de la formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à mélanger le poly(Leu-bloc-Glu) à l'état pulvérulent, avec une phase aqueuse contenant l'insuline.

- 12 – Procédé de préparation de la formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à mettre en suspension le solide pulvérulent selon la revendication 8 dans un milieu liquide aqueux, de préférence sous agitation, à ajouter éventuellement des excipients, au besoin à ajuster le pH à une valeur comprise entre 5,8 et 7,0 et éventuellement à filtrer la suspension ainsi obtenue.

**13** – Médicament caractérisé en ce qu'il comprend de la formulation injectable d'insuline longue action selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et/ou de la formulation obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 12 et/ou du solide pulvérulent selon la revendication 9.

5

**14** – Médicament selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il est destiné au traitement du diabète.

10

**15** – Médicament selon la revendication 13 ou 14, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'assurer au patient diabétique, après une injection sous-cutanée, un niveau basal d'insuline pendant au moins 24 heures.

15

**16** – Médicament selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, caractérisé en ce qu'il est constitué par une présentation galénique comprenant, d'une part, du solide pulvérulent selon la revendication 9 et, d'autre part, de manière séparée, du liquide aqueux pour la reconstitution, avant l'administration, de la formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et/ou de la formulation obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 12.



## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/28

A61K9/10

A61K9/51

A61K47/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, COMPENDEX

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 734 720 A (FLAMEL TECHNOLOGIES) 2 October 1996 (1996-10-02) cited in the application page 4, line 44 - line 54; example 14.	1-16
Y	FR 2 801 226 A (FLAMEL TECHNOLOGIES) 25 May 2001 (2001-05-25) cited in the application examples 8,9	1-16



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&amp;\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 November 2005

Date of mailing of the international search report

23/11/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bochelen, D

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CONSTANCIS A ET AL: "Macromolecular colloids of diblock poly(amino acids) that bind insulin" JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE 15 SEP 1999 UNITED STATES, vol. 217, no. 2, 15 September 1999 (1999-09-15), pages 357-368, XP002319782 ISSN: 0021-9797 page 358, column 1 -----	1-16
A	US 2004/038885 A1 (BRYSON NATHAN ET AL) 26 February 2004 (2004-02-26) example 4 -----	1-16
A	US 6 180 141 B1 (LEMERCIER ALAIN ET AL) 30 January 2001 (2001-01-30) example 1 -----	1-16

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0734720	A	02-10-1996	AT 194490 T	15-07-2000
			AU 706746 B2	24-06-1999
			AU 5337796 A	16-10-1996
			BR 9607863 A	30-06-1998
			CA 2215254 A1	03-10-1996
			CN 1183040 A	27-05-1998
			DE 69609222 D1	17-08-2000
			DE 69609222 T2	22-03-2001
			DK 734720 T3	06-11-2000
			ES 2151138 T3	16-12-2000
			FR 2732218 A1	04-10-1996
			WO 9629991 A1	03-10-1996
			GR 3034613 T3	31-01-2001
			IN 185295 A1	23-12-2000
			JP 11503118 T	23-03-1999
			NZ 305392 A	26-08-1998
			PT 734720 T	29-12-2000
			US 5904936 A	18-05-1999
			ZA 9602446 A	07-08-1996
FR 2801226	A	25-05-2001	AT 247460 T	15-09-2003
			AU 781539 B2	26-05-2005
			AU 7798600 A	04-06-2001
			BR 0015690 A	09-07-2002
			CA 2391986 A1	31-05-2001
			CN 1399541 A	26-02-2003
			DE 60004704 D1	25-09-2003
			DE 60004704 T2	08-07-2004
			DK 1239836 T3	24-11-2003
			EP 1239836 A1	18-09-2002
			ES 2206311 T3	16-05-2004
			WO 0137809 A1	31-05-2001
			JP 2003514844 T	22-04-2003
			MX PA02005191 A	22-09-2003
			PT 1239836 T	30-01-2004
			ZA 200203618 A	07-05-2003
US 2004038885	A1	26-02-2004	AU 9396001 A	15-04-2002
			BR 0114512 A	21-10-2003
			CA 2425906 A1	11-04-2002
			CN 1468144 A	14-01-2004
			EP 1322411 A1	02-07-2003
			FR 2814952 A1	12-04-2002
			WO 0228521 A1	11-04-2002
			JP 2004510753 T	08-04-2004
US 6180141	B1	30-01-2001	AT 206912 T	15-11-2001
			AU 2166097 A	10-10-1997
			CA 2249274 A1	25-09-1997
			DE 69707433 D1	22-11-2001
			DE 69707433 T2	06-06-2002
			DK 888110 T3	04-02-2002
			EP 0888110 A1	07-01-1999
			ES 2167727 T3	16-05-2002
			FR 2746035 A1	19-09-1997
			WO 9734584 A1	25-09-1997
			JP 2000507934 T	27-06-2000
			PT 888110 T	29-04-2002

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> A61K38/28      A61K9/10      A61K9/51      A61K47/42		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, COMPENDEX		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 734 720 A (FLAMEL TECHNOLOGIES) 2 octobre 1996 (1996-10-02) cité dans la demande page 4, ligne 44 - ligne 54; exemple 14	1-16
Y	FR 2 801 226 A (FLAMEL TECHNOLOGIES) 25 mai 2001 (2001-05-25) cité dans la demande exemples 8,9	1-16
----- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
* A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent * E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date * L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) * O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens * P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée * T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention * X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément * Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier * &* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  16 novembre 2005		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  23/11/2005
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Bochelen, D

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	CONSTANCIS A ET AL: "Macromolecular colloids of diblock poly(amino acids) that bind insulin" JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE 15 SEP 1999 UNITED STATES, vol. 217, no. 2, 15 septembre 1999 (1999-09-15), pages 357-368, XP002319782 ISSN: 0021-9797 page 358, colonne 1 -----	1-16
A	US 2004/038885 A1 (BRYSON NATHAN ET AL) 26 février 2004 (2004-02-26) exemple 4 -----	1-16
A	US 6 180 141 B1 (LEMERCIER ALAIN ET AL) 30 janvier 2001 (2001-01-30) exemple 1 -----	1-16

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0734720	A	02-10-1996	AT 194490 T	15-07-2000
			AU 706746 B2	24-06-1999
			AU 5337796 A	16-10-1996
			BR 9607863 A	30-06-1998
			CA 2215254 A1	03-10-1996
			CN 1183040 A	27-05-1998
			DE 69609222 D1	17-08-2000
			DE 69609222 T2	22-03-2001
			DK 734720 T3	06-11-2000
			ES 2151138 T3	16-12-2000
			FR 2732218 A1	04-10-1996
			WO 9629991 A1	03-10-1996
			GR 3034613 T3	31-01-2001
			IN 185295 A1	23-12-2000
			JP 11503118 T	23-03-1999
			NZ 305392 A	26-08-1998
			PT 734720 T	29-12-2000
			US 5904936 A	18-05-1999
			ZA 9602446 A	07-08-1996
FR 2801226	A	25-05-2001	AT 247460 T	15-09-2003
			AU 781539 B2	26-05-2005
			AU 7798600 A	04-06-2001
			BR 0015690 A	09-07-2002
			CA 2391986 A1	31-05-2001
			CN 1399541 A	26-02-2003
			DE 60004704 D1	25-09-2003
			DE 60004704 T2	08-07-2004
			DK 1239836 T3	24-11-2003
			EP 1239836 A1	18-09-2002
			ES 2206311 T3	16-05-2004
			WO 0137809 A1	31-05-2001
			JP 2003514844 T	22-04-2003
			MX PA02005191 A	22-09-2003
			PT 1239836 T	30-01-2004
			ZA 200203618 A	07-05-2003
US 2004038885	A1	26-02-2004	AU 9396001 A	15-04-2002
			BR 0114512 A	21-10-2003
			CA 2425906 A1	11-04-2002
			CN 1468144 A	14-01-2004
			EP 1322411 A1	02-07-2003
			FR 2814952 A1	12-04-2002
			WO 0228521 A1	11-04-2002
			JP 2004510753 T	08-04-2004
US 6180141	B1	30-01-2001	AT 206912 T	15-11-2001
			AU 2166097 A	10-10-1997
			CA 2249274 A1	25-09-1997
			DE 69707433 D1	22-11-2001
			DE 69707433 T2	06-06-2002
			DK 888110 T3	04-02-2002
			EP 0888110 A1	07-01-1999
			ES 2167727 T3	16-05-2002
			FR 2746035 A1	19-09-1997
			WO 9734584 A1	25-09-1997
			JP 2000507934 T	27-06-2000
			PT 888110 T	29-04-2002